



A 3

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/82, A61K 38/00</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/29200</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. August 1997 (14.08.97)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00285</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 7. Februar 1997 (07.02.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 04 588.6 8. Februar 1996 (08.02.96) DE 196 20 804.1 23. Mai 1996 (23.05.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZEN-FORSCHUNG [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CONRAD, Udo [DE/DE]; Feldstrasse 10, D-06458 Hausneindorf (DE). FIEDLER, Ulrike [DE/DE]; Finkenweg 6, D-06466 Gatersleben (DE). PHILLIPS, Julian [DE/DE]; Bahnhofstrasse 1, D-06466 Gatersleben (DE). ARTSAENKO, Olga [DE/DE]; Selkeweg 4a, D-06466 Gatersleben (DE).</p> <p>(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(54) Title: CASSETTES FOR THE EXPRESSION OF STORABLE PROTEINS IN PLANTS</p> <p>(54) Bezeichnung: KASSETTEN ZUR EXPRESSION VON LAGERSTABILEN PROTEINEN IN PFLANZEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to cassettes for the expression of storable gene products in leaves and specifically in seeds, especially single-chain antibody fragments in leaves and seeds of transgenic tobacco and pea plants. The fields of application of the invention are biotechnology, medicine (diagnosis and therapy), foodstuffs and plant control and agriculture. The expression cassette of the invention comprises constitutive or seed-specific promoters, the LeB4 signal peptide, a gene to be expressed and an ER retention signal. Preference is given to an expression cassette containing the CaMV 35S promoter as the constitutive promoter, the gene for a single-chain antibody fragment as the gene and the amino acid sequence KDEL as the ER retention signal.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft Kassetten für die Expression von lagerstabilen Genprodukten in Blättern und spezifisch in Samen, insbesondere von Einketten-Antikörperfragmenten in Blättern und Samen transgener Tabak- und Erbsenpflanzen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Biotechnologie, die Medizin (Diagnostik und Therapie), die Lebensmittel- und Pflanzenkontrolle sowie die Landwirtschaft. Die erfindungsgemäße Expressionskassette umfaßt: konstitutive bzw. samenspezifische Promotoren; das LeB4-Signalpeptid; ein zu exprimierendes Gen und ein ER-Retentionssignal. Bevorzugt ist eine Expressionskassette, die als konstitutiven Promoter den CaMV 35S-Promoter, als Gen das Gen für ein Einketten-Antikörperfragment und als ER-Retentionssignal die Aminosäuresequenz KDEL enthält.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LJ	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Kassetten zur Expression von lagerstabilen Proteinen in Pflanzen

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Kassetten für die Expression von lagerstabilen Proteinen in Pflanzen, insbesondere von Einketten-Antikörperfragmenten in transgenen Tabak- oder Erbsenpflanzen.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Biotechnologie, die Medizin (Diagnostik und Therapie), die Lebensmittel- und Pflanzenkontrolle sowie die Landwirtschaft.

Etablierte und zuverlässige Methoden der Genklonierung und der Gentechnik und jüngste Entwicklungen der Technologie transgener Pflanzen ermöglichen weitere Fortschritte in der Pflanzenbiotechnologie. Pflanzenteile können mehr und mehr als Produktionsstätten für Stoffe, die sonst schwer zugänglich sind, dienen. So ist es gelungen, Immunglobuline in Blättern transgener Tabakpflanzen zur Expression zu bringen. Die dabei erzielten Ergebnisse liegen zwischen 0.1 und 1.3 % des gesamten löslichen Proteins des Blattes. Die Expression erfolgte entweder cytoplasmatisch oder in Apoplasten pflanzlicher Zellen.

Durch Anhängen eines Signals zur Retention im endoplasmatischen Retikulum (ER) an ein Einketten-Antikörpergen (scFv-Gen) kann der Antikörper in diesem speziellen Kompartiment von Blattzellen transgener Pflanzen fixiert werden. Diese Fixierung führt zu einer Steigerung der Expressionsrate von Einketten-Antikörperfragmenten in Blättern transgener Pflanzen auf 4.8% des gesamten löslichen Proteins (Artsaenko et al., Plant J. 8, 745-750 (1995)). Diese Befunde wurden prinzipiell von anderen bestätigt, wenn auch die absoluten Expressionswerte nicht erreicht wurden.

Weitere Arbeiten betreffen die spezifische Expression von Genprodukten in pflanzlichen Speicherorganen, vor allem in

Samen. Mit Hilfe eines samenspezifischen Promoters konnten Einketten-Antikörperfragmente stabil bis zu 0,67% des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10, 1090-1094 (1995)).

Trotz dieser Fortschritte waren die erreichten Expressionsraten in Pflanzen bisher zu gering, um eine pflanzenbiotechnologische Produktion der gewünschten Stoffe darauf zu begründen.

Ziel der Erfindung war es, die samenspezifische Expression in transgenen Pflanzen auf eine für eine Stoffproduktion geeignete Basis zu stellen. Ein weiteres Ziel besteht darin, eine biologische Basis für den Einsatz einer einfachen und handhabbaren Ernte- und Verarbeitungstechnologie zu schaffen, vor allem zu sichern, daß das in der Pflanze gebildete Genprodukt im Zeitraum zwischen der unmittelbaren Ernte und den nachfolgenden Extraktions- und Reinigungsschritten in Menge und gewünschter Aktivität bei normalen Temperaturen ohne Kühlung stabil erhalten bleibt.

Die Zielstellung der Erfindung wird mit den in den Ansprüchen 1-11 beschriebenen Expressionskassetten erreicht.

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten enthalten einen Promoter (bevorzugt einen konstitutiven Promoter wie den CaMV 35S-Promoter oder einen samenspezifischen Promoter), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal.

Der Aufbau der Kassetten ist in den Abbildungen 1 und 2 am Beispiel eines Einketten-Antikörpergens (scFv-Gen) schematisch dargestellt.

Die Expressionskassette gemäß Abb. 1 wird bevorzugt zur Expression von Genen von Einketten-Antikörperfragmenten eingesetzt. Vorteilhaft ist auch die Verwendung von Genen rekombinanter Antikörperfragmente als Translationsfusion mit

anderen funktionellen Proteinen wie zum Beispiel einem zweiten rekombinanten Antikörper, Enzymen, Toxinen, Chromophoren und Bindungsproteinen. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (= Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Von besonderer Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg der Kassette gemäß Abb. 2 ist das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL, die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Im Falle des Einsatzes des LeB4-Promoters beträgt die samenspezifische Expression ca 1,9% des gesamten löslichen Proteins, wobei die Einketten-Antikörperexpression ab Tag 16 der Samenentwicklung beginnt. Besonders vorteilhaft ist der Einsatz des USP-Promoters zum Aufbau der Expressionskassette. Er wird während der Samenentwicklung früher aktiv, wodurch der zur Anreicherung des exprimierten Produkts zur Verfügung stehende Zeitraum verlängert wird. Die Expressionsrate liegt daher höher als bei Kassetten mit dem LeB4-Promoter.

Die Expressionskassetten werden erfindungsgemäß durch Elektroporation in Bakterienstämme transferiert. Die entstandenen rekombinanten Klone werden zur Transformation von dicotylen Pflanzen verwendet. Pflanzen, die Genprodukte exprimieren, werden selektiert und als genetisch stabile Linien gezüchtet. Die Genprodukte (u. a. Einketten-Antikörperfragmente) werden nach der Ernte, ggf. nach einer Trocknung des Pflanzengewebes, extrahiert. Als dicotyle Pflanzen sind Tabak- und Erbsenpflanzen besonders geeignet.

Die Wirkung der erfindungsgemäßen Kassetten war überraschend, weil aus eigenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen bekannt ist, daß stabil exprimierte Antikörper z. B. im Samen auch ohne ER-Retentionssignal im ER oder in ER-abgeleiteten Vesikeln liegen. Deshalb war nicht zu erwarten, daß die

erfindungsgemäße Fusion mit einem Retentionssignal eine deutliche Steigerung der Expressionshöhe bewirkt.

Durch die Erfindung wird ermöglicht, sonst schwer zugängliche Stoffe, z. B. Immunglobuline, mit hoher Expressionsrate in Pflanzen zu exprimieren und dadurch für eine biotechnologische Nutzung zur Verfügung zu stellen. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß Einketten-Antikörperfragmente bei der Lagerung z. B. in Tabaksamen längere Zeit (mindestens ein Jahr) stabil bleiben.

Ebenso überraschend war, daß Einketten-Antikörperfragmente, die in Blättern exprimiert wurden, nach Trocknung dieser Blätter bei Raumtemperatur ebenfalls für mehrere Tage stabil bleiben.

Damit ist ausreichend Zeit gegeben, den Transport vom Feld in die verarbeitende Einrichtung durchzuführen bzw. sogar eine gewisse Zeit zu lagern, ohne daß Ausbeuteverluste eintreten. Ursache dieser Stabilität ist das durch die Erfindung bewirkte kompartimentspezifische Vorkommen der Genprodukte, was bedingt, daß sie vor proteolytischem Abbau geschützt sind.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Beispiel 1

Expression und Anreicherung des Einketten-Antikörper fragmentes scFv-ox im endoplasmatischen Retikulum von transgenen Tabaksamen

Ausgangspunkt der Untersuchungen war ein monoklonaler Antikörper (NQ10.-12.5, Berek and Milstein, 1988), dessen Epitope gegen ein nicht in Pflanzen vorkommendes Antigen (Phenyloxazon) gerichtet sind, um eventuelle Einflüsse auf

den pflanzlichen Metabolismus auszuschließen und der außerdem eine hohe Bindungsaffinität aufweist. Die Hybridomazelllinie NQ 10/12.5 ist dadurch charakterisiert, daß die sekretierten, gegen das Antigen Phenyloxazon gerichteten monoklonalen Antikörper eine hohen Affinität aufweisen (Dissoziationskonstante 1×10^{-8} M) und die spezifischen Sequenzen der Immunglobulingene verfügbar sind (Berek et al., 1985). Dieser monoklonale Antikörper war Ausgangspunkt für die Konstruktion des Einketten-Antikörperfragmentes -scFv-ox.

Zunächst wurde mRNA aus den Hybridomzellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als Matrize für die Amplifikation der variablen Immunglobulingene VH und VK mit den spezifischen Primern VH1 BACK und VH FOR-2 für die schwere Kette sowie VK2 BACK und MJK5 FON X für die leichte Kette (Clackson et al., 1991). Die isolierten variablen Immunglobulingene waren Ausgangspunkt für die Konstruktion eines Einketten-Antikörperfragmentes (scFv). Bei der nachfolgenden Fusions-PCR wurden drei Komponenten VH, VK und ein Linkerfragment in einem PCR-Reaktionsansatz vereinigt und das scFv-ox amplifiziert (Abb. 3). Das konstruierte scFv-ox-Gen hatte eine Größe von 735 bp. Die variablen Domänen wurden in der Reihenfolge VH-L-VL miteinander fusioniert.

Die funktionelle Charakterisierung (Antigenbindungsaktivität) des konstruierten scFv-ox-Gens erfolgte nach Expression in einem bakteriellen System. Das scFv-ox wurde dazu als lösliches Antikörperfragment synthetisiert (Hoogenboom et al., 1991). Die Aktivität und die Spezifität des konstruierten Antikörperfragmentes wurde in ELISA-Tests überprüft (Abb.4).

Um eine samenspezifische Expression des Antikörperfragmentes in Tabak zu ermöglichen, wurde das scFv-Gen stromabwärts vom LeB4-Promoter kloniert. Der aus *Vicia faba* isolierte LeB4-Promoter zeigt eine streng samenspezifische Expression von verschiedenen Fremdgenen in Tabak (Bäumlein et al., 1987, 1991). Durch Transport des scFv-Proteins in das

endoplasmatische Retikulum wurde eine stabile Akkumulation hoher Antikörperfragmentmengen erreicht. Das scFv-Gen wurde dafür mit einer Signalpeptidsequenz, die den Eintritt in das endoplasmatische Retikulum und dem ER-Retentionssignal SEKDEL, das ein Verbleiben im ER gewährleistet (Wandelt et al., 1992), fusioniert. (Abb. 5).

Die konstruierte Expressionskassette (Konstrukt 11) wurde in den binären Vektor pGSLUC1 (Saito et al., 1990) kloniert und durch Elektroporation in den *Agrobacterium*-Stamm EHA 101 transferiert. Rekombinante *Agrobacterien*klone wurden für die nachfolgende Transformation von *Nicotiana tabacum* verwendet. Pro Konstrukt wurden 70-140 Tabakpflanzen regeneriert. Von den regenerierten transgenen Tabakpflanzen wurden nach Selbstbefruchtung sowohl reife als auch Samen verschiedener Entwicklungsstadien geerntet. Von diesen Samen wurden die löslichen Proteine nach Extraktion in einem wässrigen Puffersystem erhalten. Die Analyse der transgenen Pflanzen der Serie 11 zeigt, daß durch die Fusion des scFv-Gens mit der DNA-Sequenz des ER-Retentionssignals SEKDEL eine maximale Akkumulation von 1,9 % scFv-Proteine im reifen Samen erzielt werden konnte (Tab. 1).

Konstrukt	Anzahl der regenerierten Pflanzen	Anzahl der transgenen Pflanzen	Anzahl der scFv-Protein exprimierenden Pflanzen	durchschnittliches/höchstes Expressionsniveau (% vom TSP)	durchschnittliche spezifische Aktivität (OD/ μ g scFv)
11 LeB4-SP-scFv-Tag-KDEL	103	65	63	0,98/1,90	1,36

Tab. 1: Zusammenfassende Darstellung des verwendeten samenspezifischen Konstruktes, der Anzahl getesteter und transgener Pflanzen, deren durchschnittliche

scFv-Proteinexpression im reifen Samen sowie die Antigenbindungsaktivität der Antikörperfragmente. Die Expressionsniveaus wurden durch Western-Blot - Analysen, die spezifische Bindungsaktivität mittels direktem ELISA bestimmt.

Neben Untersuchungen zur Akkumulation sollte der Frage nachgegangen werden, ob die im reifen Samen abgelagerten Antikörperfragmente noch ihre biologische Aktivität besitzen, d. h. das entsprechende Antigen Oxazolon noch spezifisch binden. Die spezifische Aktivität wurde in den Extrakten der reifen Tabaksamen mit einem direkten ELISA bestimmt. Die dabei erhaltenen Werte, die in Tab. 1 aufgeführt sind, zeigen deutlich, daß die aus trockenem Tabaksamen hergestellten Proteinextrakte funktionell aktive Antikörperfragmente enthalten. In weiteren Experimenten wurde die Stabilität der im reifen Samen akkumulierten Antikörperfragmente nach Lagerung untersucht. Dazu wurden die Tabaksamen ca. 1 Jahr bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Untersuchungen ergaben, daß die Menge und die Aktivität der akkumulierten Antikörperfragmente auch nach einjähriger Lagerung erhalten bleibt. Das pflanzliche Wachstum und die Samenentwicklung bzw. -produktion wurden durch die Synthese der rekombinanten Proteine nicht beeinflusst.

Beispiel 2

Samenspezifische Expression und Anreicherung von Einketten-Antikörperfragmenten im endoplasmatischen Retikulum von Zellen transgener Tabaksamen kontrolliert durch den USP-Promotor

Ausgangspunkt der Untersuchungen war ein ein Einzelketten-Antikörperfragment gegen das Phytohormon Abscisinsäure (Artsaenko et al., 1994).

Die funktionelle Charakterisierung (Antigenbindungsaktivität) dieses konstruierten scFv-aABA-Genes erfolgte nach Expression

in einem bakteriellen System und nach Expression in Tabakblättern (Artsaenko et al., 1994, 1995). Die Aktivität und die Spezifität des konstruierten Antikörperfragmentes wurde in ELISA-Testen überprüft.

Um eine samenspezifische Expression des Antikörperfragmentes in Tabak zu ermöglichen, wurde das scFv-Gen stromabwärts vom USP-Promoter kloniert. Der aus *Vicia faba* isolierte USP-Promoter zeigt eine streng samenspezifische Expression von verschiedenen Fremdgenen in Tabak (Fiedler et al., 1993). Durch Transport des scFv-Proteins in das endoplasmatische Retikulum wurde eine stabile Akkumulation hoher Antikörperfragmentmengen erreicht. Das scFv-Gen wurde dafür mit einer Signalpeptidsequenz, die den Eintritt in das endoplasmatische Retikulum und dem ER-Retentionssignal SEKDEL, das ein Verbleiben im ER gewährleistet (Wandelt et al., 1992), fusioniert (Abb. 6).

Die konstruierte Expressionskassette wurde in den binären Vektor pGSGLUC1 (Saito et al., 1990) kloniert und durch Elektroporation in den *Agrobacterium*-Stamm EHA 101 transferiert. Rekombinante *Agrobacterien*klone wurden für die nachfolgende Transformation von *Nicotiana tabacum* verwendet. Von den regenerierten transgenen Tabakpflanzen wurden nach Selbstbefruchtung sowohl reife als auch Samen verschiedener Entwicklungsstadien geerntet. Von diesen Samen wurden die löslichen Proteine nach Extraktion in einem wässrigen Puffersystem erhalten. Die Analyse der transgenen Pflanzen zeigt, daß durch die Fusion des scFv-Gens mit der DNA-Sequenz des ER-Retentionssignals SEKDEL unter Kontrolle des USP-Promotors bereits ab Tag 10 der Samenentwicklung Einketten-Antikörperfragmente synthetisiert wurden.

Im Verlaufe der Samenentwicklung kam es zu einer deutlich stärkeren Anreicherung des Einketten-Antikörperfragmentes im Vergleich zur LeB4-Promotor-kontrollierten Expression.

Beispiel 3

Expression und stabile Akkumulation des Einketten-Antikörperfragmentes scFv-ox im Blatt transgener Tabakpflanzen und Erhalt der biologischen Aktivität nach Ernte bzw. Trocknung des Blattmaterials

Die Konstruktion des Einketten-Antikörperfragmentes scFv-ox aus dem monoklonalen Antikörper NQ 10-12.5 (Berek und Milstein, Immunol. Rev. 105, 5 - 26 (1988)) und dessen funktionelle Charakterisierung nach Expression im bakteriellen System siehe Beispiele 1 und 2. Um eine ubiquitäre Expression des Antikörperfragmentes in der Pflanze, speziell in Blättern, zu erreichen, wurde das scFv-ox-Gen stromabwärts vom CaMV 35S-Promoter kloniert. Dieser starke virale, konstitutive Promoter vermittelt eine Expression von Fremdgenen in nahezu allen pflanzlichen Geweben (Benfey und Chua, Science 250, 956- 966 (1990)). Durch Transport des scFv-Proteins in das endoplasmatische Retikulum wurde eine stabile Akkumulation hoher Antikörperfragmentmengen im Blattmaterial erreicht. Das scFv-Gen wurde zunächst mit einer Signalpeptidsequenz, die den Eintritt in das endoplasmatische Retikulum und dem ER-Retentionssignal KDEL, das ein Verbleiben im ER gewährleistet (Wandelt et al., Plant J. 2, 181 - 192 (1992)), fusioniert (Abb. 1).

Die konstruierte Expressionskassette (Konstrukt 9) wurde in den binären Vektor pGSGlUC1 (Saito et al., Plant Cell Rep. 8, 718 - 721 (1990)) kloniert und durch Elektroporation in den Agrobakterium-Stamm EHA 101 transferiert. Rekombinante Agrobakterienklone wurden für die nachfolgende Transformation von *Nicotiana tabacum* verwendet. Es wurden ungefähr 100 Tabakpflanzen regeneriert. Von den regenerierten transgenen Tabakpflanzen wurde Blattmaterial verschiedener Entwicklungsstufen entnommen. Von diesem Blattmaterial wurden die löslichen Proteine nach Extraktion in einem wässrigen Puffersystem erhalten. Nachfolgende Analysen (Western-Blot-

Analysen und ELISA-Tests) zeigten, daß in Blättern der Serie 9 eine maximale Akkumulation von etwa 4% an biologisch aktivem, antigenbindendem scFv-Protein erzielt werden konnte (Tab. 2). Die hohen Expressionswerte wurden in ausgewachsenen grünen Blättern ermittelt, aber selbst in senszentem Blattmaterial konnte das Antikörperfragment noch nachgewiesen werden.

Konstrukt	Anzahl der regenerierten Pflanzen	Anzahl der transgenen Pflanzen	Anzahl der scFv-Protein exprimierenden Pflanzen	Durchschnittliches/höchstes Expressionsniveau im Blatt (% vom TSP)	Durchschnittliche Antigenbindungsaktivität im Blatt (OD/ μ g scFv)
9 CaMV 35S-SP - scFv-Tag-KDEL	96	77	74	1,1/4,0	2,5

Tab. 2: Zusammenfassende Darstellung des verwendeten Konstruktes, das eine ubiquitäre Expression des scFv-Gens vermittelt, der Anzahl getesteter und transgener Pflanzen, deren durchschnittliche scFv-Protein Expression im Blatt und die Antigenbindungsaktivität der Antikörperfragmente in den Blattextrakten. Die Expressionsniveaus wurden durch Western-Blot-Analysen und die Antigenbindungsaktivität mit einem direkten ELISA bestimmt.

Da bei der Isolierung von Antikörperfragmenten im größeren, auch industriellen Maßstab, längere Inkubationszeiten unvermeidlich sein können, sollte getestet werden, ob das scFv-Protein nach Extraktion aus dem jeweiligen Gewebe in dem verwendeten Puffersystem stabil ist. Dazu wurden von scFv-Fragment exprimierenden Pflanzen Extrakte aus Blättern her-

gestellt und für 1 bis 4 h bei Raumtemperatur ohne Zusatz von Proteaseinhibitoren inkubiert. Es zeigte sich, daß es innerhalb des getesteten Zeitraumes zu keinem nachweisbaren Abbau der Antikörperfragmente in den Extrakten von Blättern kam. Ursache der Stabilität kann das kompartimentspezifische Vorkommen der Antikörperfragmente sein, was dazu führt, daß diese sich nach Homogenisierung des Gewebes nicht zusammen mit den Proteasen im löslichen Überstand befinden.

Neben der Stabilität in dem für die Extraktion verwendeten Puffersystem spielt die Möglichkeit der Lagerung des scFv-Proteins eine ebenso große Rolle, da oftmals keine direkte Verarbeitung des geernteten Materials erfolgen kann. In Beispiel 1 ist bereits beschrieben worden, daß bei Expression im Samen eine Lagerung für mindestens ein Jahr bei RT, ohne einen meßbaren Verlust des akkumulierten Antikörpers oder dessen Aktivität, erfolgen kann. Die Lagerung von grünem Gewebe unter Erhalt der Antikörpermenge und -aktivität ist jedoch nicht ohne weiters zu erwarten. Trotzdem wurde dies in Trocknungsversuchsreihen überprüft. Dazu wurden ausgewachsene Blätter von 5 Pflanzen der Serie 9 geerntet. Ein Teil des Blattes wurde sofort eingefroren (Lagerung bei -20°C) und ein anderer bei RT getrocknet und eine Woche unter den gleichen Bedingungen gelagert. Parallel dazu wurden Blätter bei 50°C getrocknet und drei Wochen bei Raumtemperatur gelagert. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abb. 7 dargestellt.

Es zeigte sich, daß die Antikörperfragmente der bei Raumtemperatur getrockneten Blätter selbst nach einwöchiger Lagerung noch vorhanden sind. In einem anschließenden ELISA mit Extrakten der getrockneten Blätter konnte ebenfalls die Antigenbindungsaktivität des Antikörperfragmentes nachgewiesen werden. Dabei waren keine Unterschiede zwischen dem bei -20°C gelagerten und dem bei Raumtemperatur getrockneten und gelagerten Blattmaterial feststellbar. Im Gegensatz dazu konnte in bei 50°C getrockneten Blättern im Western-Blot kein scFv-Protein nachgewiesen werden (Abb. 7).

Das pflanzliche Wachstum wurde durch die Produktion der rekombinanten Proteine nicht beeinflusst.

Beispiel 4

Stabile Akkumulation des Einketten-Antikörperfragmentes gegen das Phytohormon Abscisinsäure im endoplasmatischen Retikulum und Erhalt der biologischen Aktivität nach Ernte bzw. Trocknung des Blattmaterials transgener Tabakpflanzen

Ausgangspunkt der Untersuchungen war ein in Tabakpflanzen exprimiertes Einketten-Antikörperfragment gegen das Phytohormon Abscisinsäure (Artsaenko et al., Plant J. 8, 745 - 750 (1995)). Menge und Aktivität des synthetisierten scFv-Proteins wurden in Western-Blot-Analysen und ELISA-Tests bestimmt.

Um eine Expression des scFv-Gens im endoplasmatischen Retikulum zu ermöglichen, wurde das Fremdgen unter Kontrolle des CaMV 35S-Promoters als eine Translationsfusion mit dem LeB4-Sinalpeptid (N-terminal) und der ER-Retentionssignal KDEL (C-terminal) exprimiert. Durch Transport des scFv-Proteins in das endoplasmatische Retikulum wurde eine stabile Akkumulation hoher Mengen an aktivem Antikörperfragment erreicht. Nach Ernte des Blattmaterials wurden Stücke eines Blattes bei -20° C eingefroren, lyophilisiert oder bei Raumtemperatur getrocknet. Die löslichen Proteine wurden aus den jeweiligen Blattmaterialien durch Extraktion in einem wässrigen Puffer erhalten und das scFv-Protein affinitätschromatographisch gereigt. Gleiche Mengen (Abb. 8B) an gereinigtem scFv-Protein (eingefroren, lyophilisiert und getrocknet) wurden für die Bestimmung der Aktivität des Antikörperfragmentes eingesetzt (Abb. 8A). Dabei wurden etwa gleiche Antigenbindungsaktivitäten festgestellt.

Legende zu den Abbildungen:

- Abb. 1: Schematische Darstellung der Kassette zur lagerstabilen Expression des scFv-Gens in Blättern transgener Tabakpflanzen
- Abb. 2: Schematische Darstellung der Kassette zur samenspezifischen Expression des scFv-Gens
- Abb. 3: Schematische Darstellung der Konstruktion des scFv-ox (V-Gen für V (variable) Region, L-Linker).
- Abb. 4: Funktionelle Charakterisierung des scFv-ox 9 im direkten ELISA.
- Abb. 5: Schematische Darstellung der Kassette zur samenspezifischen Expression des scFv-ox-Gens.
- Abb. 6: Schematische Darstellung der Kassette zur samenspezifischen Expression des scFv-aABA.
- Abb. 7: Untersuchungen zur Stabilität des scFv-Proteins nach Trocknung der Blätter der transgenen Pflanzen 9/21 und 9/22 bei RT und bei 50°C. Der Nachweis des scFv-Fragmentes erfolgte durch Western-Blot-Analyse. 40 µg gesamtlösliches Protein wurde aufgetragen. Spur 1: Kontrollpflanze SNN, Spur 2: 100 ng scFv-Protein, Spur 3: 9/21 RT vor Trocknung, Spur 4: 9/21 RT Trocknung und 1 Woche Lagerung, Spur 5: 9/21 50°C vor Trocknung, Spur 6: 9/21 50°C nach Trocknung, Spur 7: 9/21 50°C nach Trocknung und 3 Wochen Lagerung, Spur 8: 9/22 RT vor Trocknung, Spur 9: 9/22 RT Trocknung und 1 Woche Lagerung, Spur 10: 9/22 50°C vor Trocknung, Spur 11: 9/22 50°C nach Trocknung, Spur 12: 9/22 50°C nach Trocknung und 3 Wochen Lagerung.

ERSATZBLATT (REGEL 26)

Die Größen der Proteinmolekulargewichtsstandards sind links dargestellt.

Abb. 8: Nachweis des Erhaltes der Antigenbindungsaktivität des Antikörperfragmentes scFv-ABA in Blättern nach Trocknung oder Lyophilisierung mittels ELISA-Tests. In Abb. 3A ist die Antigenbindungsaktivität des aus frischen (1), lyophilisierten (2) und getrockneten Blättern gereinigten scFv-Proteins dargestellt. In Abb. 3B sind die jeweiligen Mengen an scFv-Protein (etwa 100 ng), die für die ELISA-Analysen eingesetzt wurden, mittels Western-Blot-Analysen bestimmt. Die Größen der Proteinmolekulargewichtsstandards sind links dargestellt.

Patentansprüche

1. Kassetten zur Expression von lagerstabilen Proteinen in Pflanzen, bestehend aus
 - einem Promoter
 - dem LeB4-Signalpeptid
 - einem zu exprimierenden Gen und
 - einem ER-Retentionssignal.
2. Expressionskassetten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Promoter ein konstitutiver Promoter ist.
3. Expressionskassetten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Promoter ein samenspezifischer Promoter ist.
4. Expressionskassette nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als konstitutiver Promoter der CaMV 35S-Promoter eingesetzt wird.
5. Expressionskassette nach Anspruch 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß als samenspezifischer Promoter der USP-Promoter eingesetzt wird.
6. Expressionskassette nach Anspruch 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß als samenspezifischer Promoter der LEB4-Promoter eingesetzt wird.
7. Expressionskassette nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als zu exprimierendes Gen das Gen eines Einketten-Antikörperfragmentes eingesetzt wird.
8. Expressionskassette nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als zu exprimierendes Gen das Gen eines rekombinanten Antikörperfragmentes als Translationsfusion mit

ERSATZBLATT (REGEL 26)

anderen funktionellen Proteinen, wie zum Beispiel einem zweiten rekombinanten Antikörper, Enzymen, Toxinen, Chromophoren und Bindungsproteinen, eingesetzt wird.

9. Expressionskassette nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß sie

- den CaMV 35S-Promoter
- das LeB4-Signalpeptid
- das Gen für ein Einketten-Antikörperfragment und
- als ER-Retentionssignal die Aminosäuresequenz KDEL enthält.

10. Expressionskassette nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß sie

- den USP-Promoter
- das LeB4-Signalpeptid
- das Gen für ein Einketten-Antikörperfragment und
- als ER-Retentionssignal die Aminosäuresequenz KDEL enthält.

11. Expressionskassette nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß sie

- den LEB4-Promoter
- das LeB4-Signalpeptid
- das Gen für ein Einketten-Antikörperfragment und
- als ER-Retentionssignal die Aminosäuresequenz KDEL enthält.

12. Verwendung der Expressionskassette nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Kassette durch Elektroporation in Bakterienstämme transferiert wird und die entstandenen rekombinanten Klone zur Transformation von dicotylen Pflanzen verwendet, Pflanzen, die Genprodukte exprimieren, selektiert, genetisch stabile Linien gezüchtet und die Genprodukte ohne Kühlung nach der Ernte, ggf. nach einer Trocknung des Pflanzengewebes, extrahiert werden.

13. Verwendung der Expressionskassette nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Kassette durch Elektroporation in Bakterienstämme transferiert wird und die entstandenen rekombinanten Klone zur Transformation von dicotylen Pflanzen verwendet, transgene Einketten-Antikörperfragmente exprimierende Pflanzen selektiert, genetisch stabile Linien gezüchtet und die Einketten-Antikörperfragmente aus getrockneten Blättern extrahiert werden.

14. Verwendung nach Anspruch 12 und 13, dadurch gekennzeichnet, daß als dicotyle Pflanzen Tabakpflanzen ausgewählt werden.

15. Verwendung nach Anspruch 12 und 13, dadurch gekennzeichnet, daß als dicotyle Pflanzen Erbsen ausgewählt werden.

16. Verwendung der Expressionskassette nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Kassette durch Elektroporation in Bakterienstämme transferiert wird die entstandenen rekombinanten Klone zur Transformation von dicotylen Pflanzen verwendet, Pflanzen, die Genprodukte exprimieren, selektiert, genetisch stabile Linien gezüchtet und die in den Organen, vorzugsweise Blättern und Samen, enthaltenen Genprodukte nach der Ernte, ggf. nach einer Trocknung und Lagerung an Nutztiere verfüttert oder direkt als Therapeutikum in der Humanmedizin eingesetzt werden.

1/8

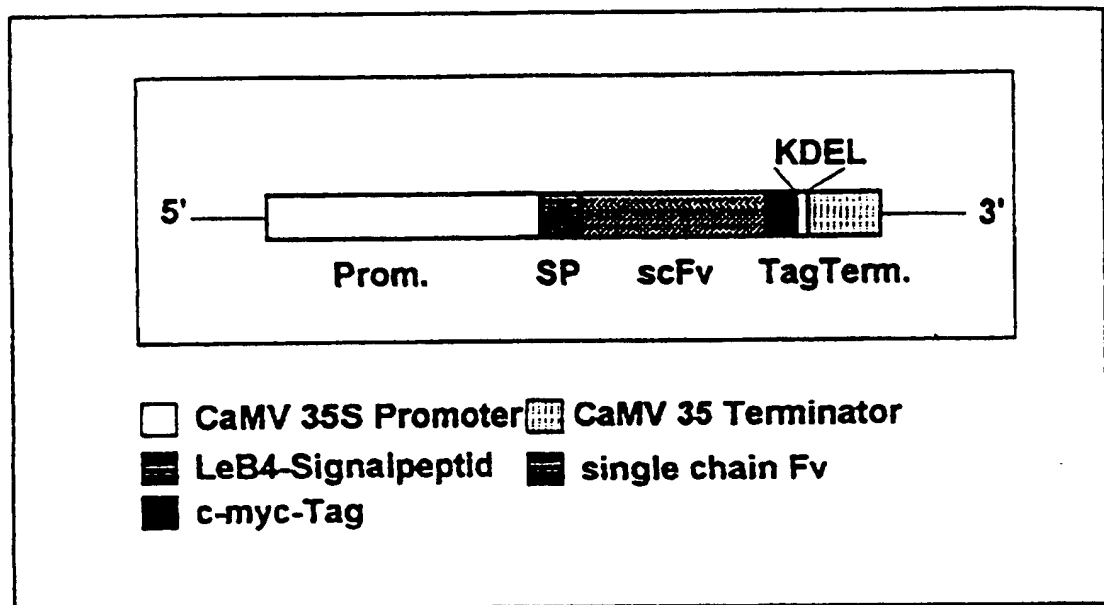


Abb. 1

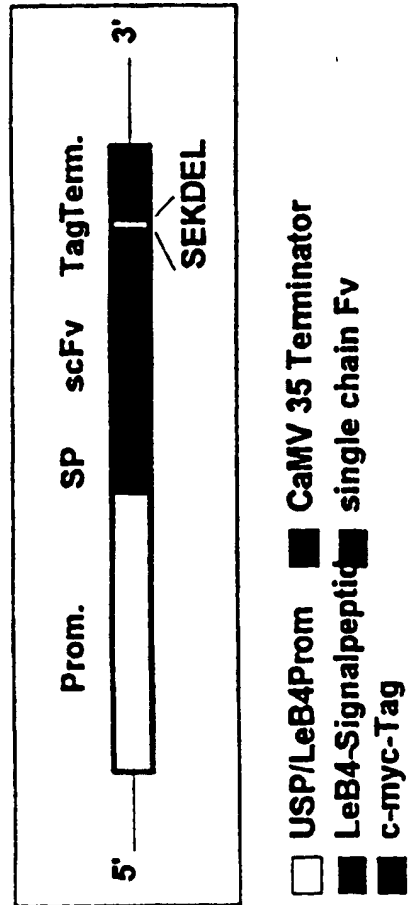


Abb. 2

3/8

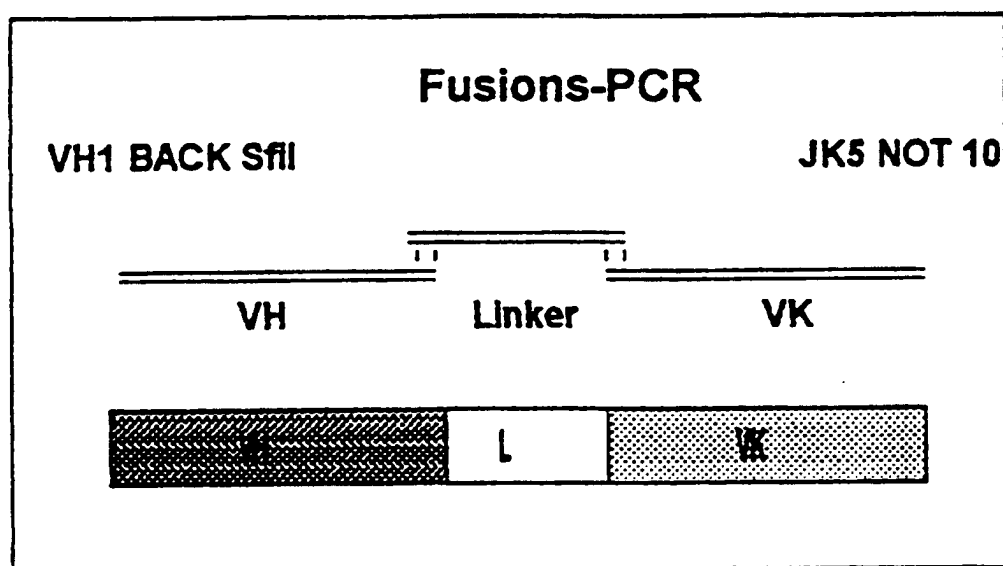


Abb. 3:

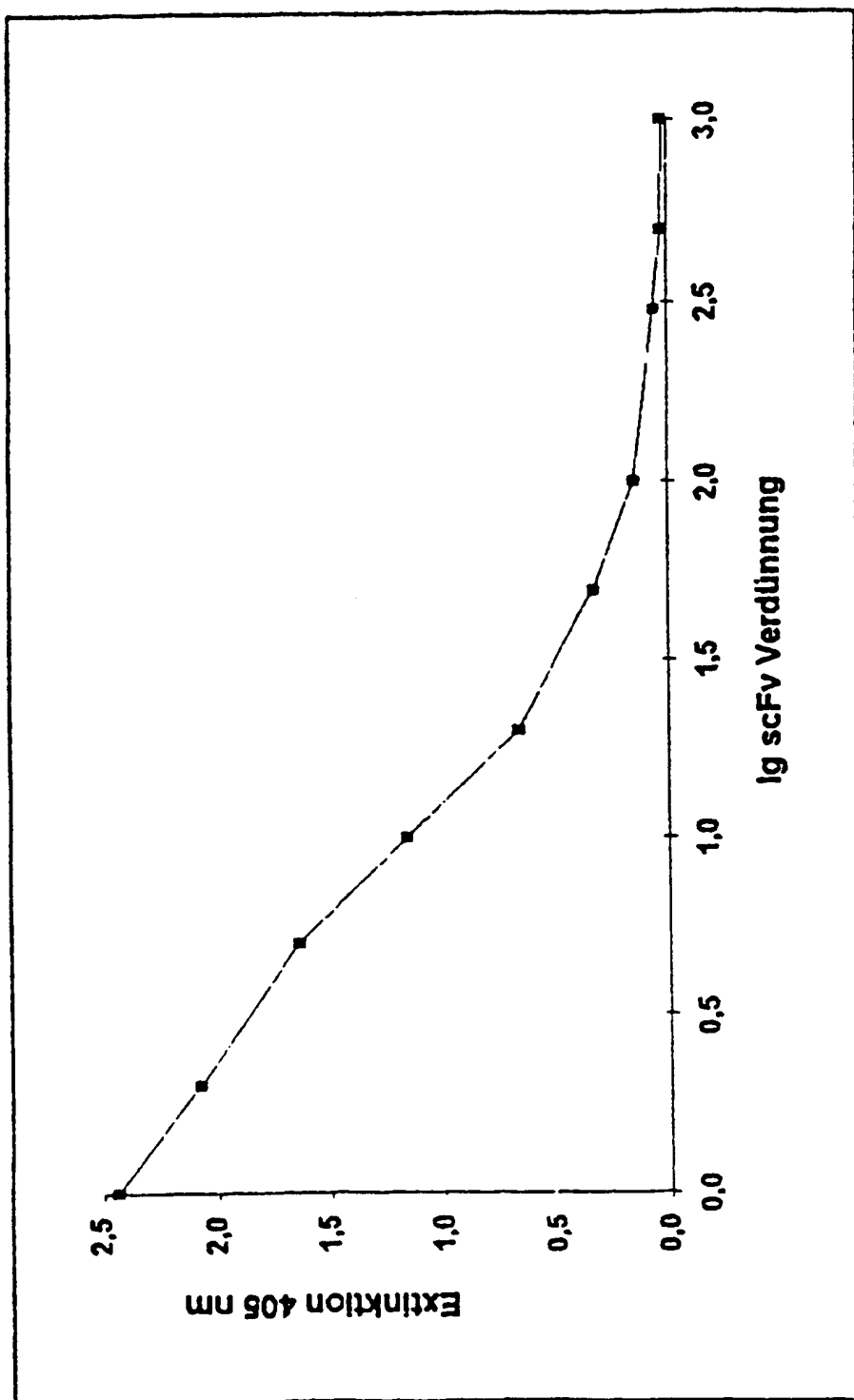


Abb. 4:

5/8

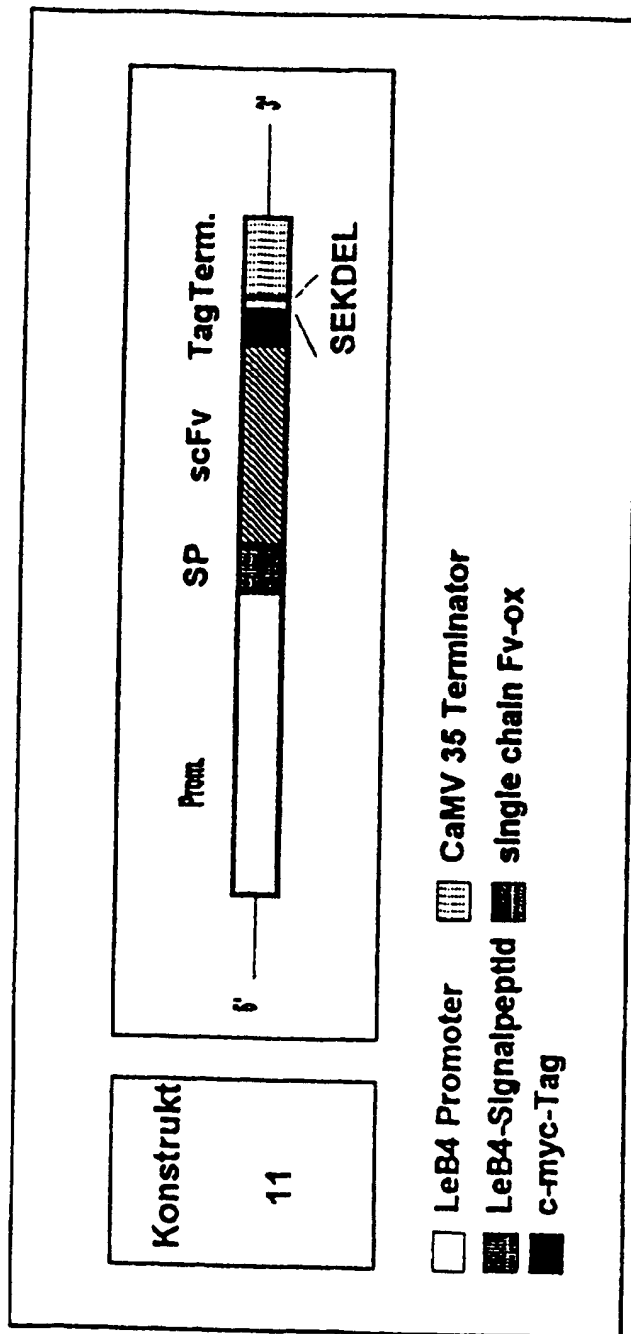


Abb. 5:

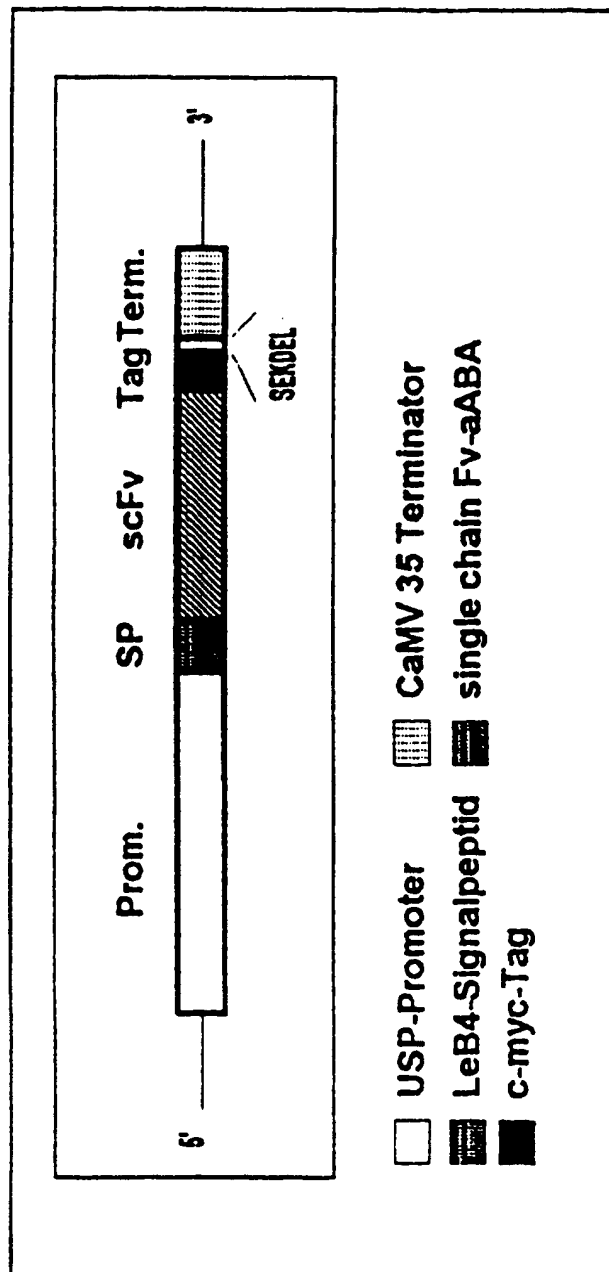


Abb. 6:

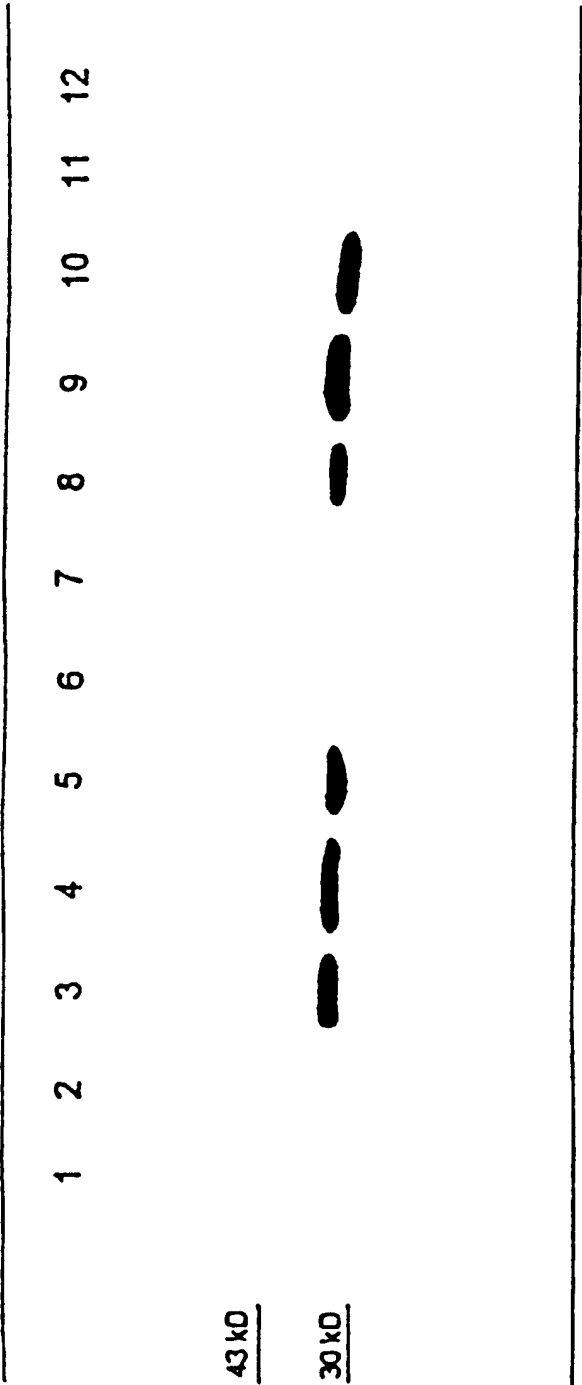


Abb. 7

8/8

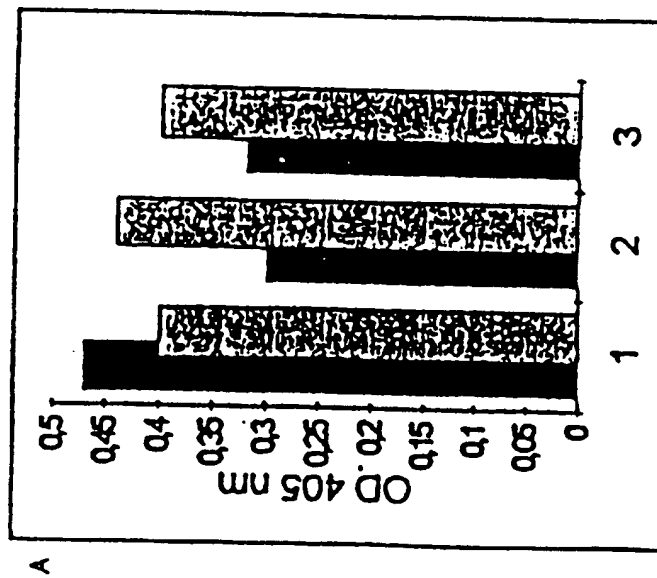
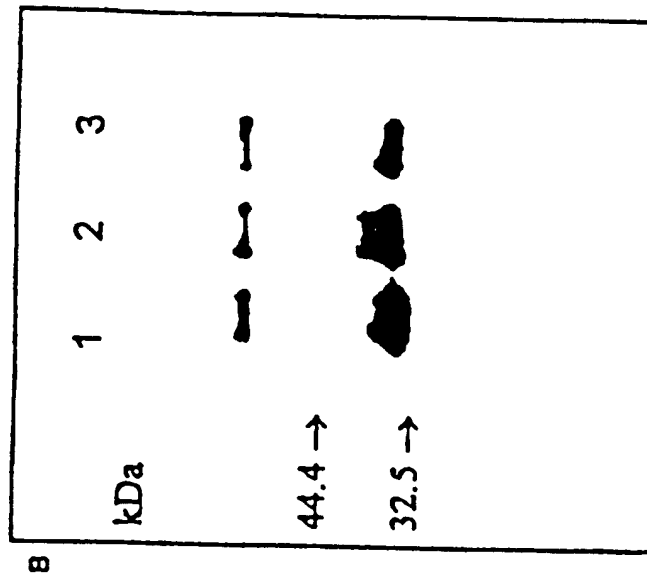


Abb. 8

ERSATZBLATT (REGEL 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 97/00285

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/82 A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIO-TECHNOLOGY (NEW YORK) 13 (10). 1995. 1090-1093., XP002033957 FIEDLER U ET AL: "High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds." see page 1092, right-hand column, paragraph 1	1,3,6-8, 11,12, 14,16
Y	---	5
Y	DD 263 081 A (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) 21 December 1988 see the whole document ---	5
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents :**

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 June 1997

Date of mailing of the international search report

16.07.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 97/00285

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PLANT JOURNAL 8 (5). 1995. 745-750. , XP002033958 ARTSAENKO O ET AL: "Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilt phenotype in transgenic tobacco." see the whole document ---	1,2,4,7, 9,12,14
A	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 23, 1993, pages 861-870, XP002033959 FIREK, S., ET AL.: "Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures" see the whole document ---	1-16
A	PLANT MOLECULAR BIOLOGY 26 (4). 1994. 1023-1030. , XP002033960 CONRAD U ET AL: "Expression of engineered antibodies in plant cells." see the whole document ---	1-16
A	THE PLANT JOURNAL, vol. 2, 1992, pages 181-192, XP002033961 WANDELT, C.I., ET AL.: "Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants " cited in the application see the whole document ---	1-11
A	THE EMBO JOURNAL, vol. 11, no. 6, 1992, pages 2345-2355, XP002033962 DENECKE, J., ET AL.: "Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope" see the whole document ---	1-11
A	WO 94 20628 A (DU PONT) 15 September 1994 see page 21, line 15 - page 22, line 14 ---	1
A	DE 39 20 034 A (PFLANZENZUECHTUNG SAATGUT VEB) 31 May 1990 see the whole document ---	5,6
A	WO 96 00783 A (CIBA GEIGY AG ;CAROZZI NADINE BARBARA (US); KOZIEL MICHAEL GENE (U) 11 January 1996 see examples 5,7 ---	8
	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nal Application No

PCT/DE 97/00285

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 657 538 A (ENEA ENTE NUOVE TEC) 14 June 1995 see the whole document ---	16
A	TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 13, December 1995, pages 522-527, XP002033963 MA, J.K.-C., ET AL.: "Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants" see the whole document ---	16
A	WO 91 06320 A (SCRIPPS CLINIC RES) 16 May 1991 see page 122 - page 123 ---	16
A	ACS SYMPOSIUM SERIES, vol. 604, 13 March 1994, pages 56-69, XP000569928 MA J K -C: "ANTIBODY EXPRESSION IN PLANTS" see page 64 - page 67 ---	16
A	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 24, no. 1, 1 January 1994, pages 131-138, XP002003170 MA J K -C ET AL: "ASSEMBLY OF MONOCLONAL ANTIBODIES WITH IGG1 AND IGA HEAVY CHAIN DOMAINS IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS" see the whole document ---	16
A	SCIENCE, vol. 268, XP002024034 HAQ, T.A., ET AL.: "Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants" see the whole document ---	1,16
P,A	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 30, 1996, pages 781-793, XP000677225 SCHOUTEN, A., ET AL.: "The c-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco" see the whole document -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DE 97/00285

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see additional information.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Observation: although claim 16 refers (PCT Rule 39.1(iv)) to a process for treatment of the human/animal body (diagnostic procedure carried out on the human/animal body), the search was carried out and based on the cited effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 97/00285

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DD 263081 A		NONE	
WO 9420628 A	15-09-94	AU 6355594 A CA 2158018 A EP 0687303 A JP 8507219 T PL 310524 A US 5633436 A	26-09-94 15-09-94 20-12-95 06-08-96 27-12-95 27-05-97
DE 3920034 A	31-05-90	NONE	
WO 9600783 A	11-01-96	AU 2573595 A CA 2193859 A	25-01-96 11-01-96
EP 0657538 A	14-06-95	IT 1264083 B	10-09-96
WO 9106320 A	16-05-91	US 5202422 A AU 6753290 A CA 2071502 A EP 0497904 A JP 5504333 T US 5639947 A	13-04-93 31-05-91 28-04-91 12-08-92 08-07-93 17-06-97

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/00285

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/82 A61K38/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikations Symbole)
IPK 6 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BIO-TECHNOLOGY (NEW YORK) 13 (10). 1995. 1090-1093., XP002033957 FIEDLER U ET AL: "High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds." siehe Seite 1092, rechte Spalte, Absatz 1 ---	1,3,6-8, 11,12, 14,16
Y	---	5
Y	DD 263 081 A (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) 21.Dezember 1988 siehe das ganze Dokument ---	5
X	PLANT JOURNAL 8 (5). 1995. 745-750. , XP002033958 ARTSAENKO O ET AL: "Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilt phenotype in transgenic tobacco." siehe das ganze Dokument ---	1,2,4,7, 9,12,14

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 - "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
 - "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 27. Juni 1997	Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts 16. 07. 97
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Maddox, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/00285

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 23, 1993, Seiten 861-870, XP002033959 FIREK, S., ET AL.: "Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures" siehe das ganze Dokument ---</p>	1-16
A	<p>PLANT MOLECULAR BIOLOGY 26 (4). 1994. 1023-1030. , XP002033960 CONRAD U ET AL: "Expression of engineered antibodies in plant cells." siehe das ganze Dokument ---</p>	1-16
A	<p>THE PLANT JOURNAL, Bd. 2, 1992, Seiten 181-192, XP002033961 WANDELT, C.I., ET AL.: "Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants " in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---</p>	1-11
A	<p>THE EMBO JOURNAL, Bd. 11, Nr. 6, 1992, Seiten 2345-2355, XP002033962 DENECKE, J., ET AL.: "Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope" siehe das ganze Dokument ---</p>	1-11
A	<p>WO 94 20628 A (DU PONT) 15.September 1994 siehe Seite 21, Zeile 15 - Seite 22, Zeile 14 ---</p>	1
A	<p>DE 39 20 034 A (PFLANZENZUECHTUNG SAATGUT VEB) 31.Mai 1990 siehe das ganze Dokument ---</p>	5,6
A	<p>WO 96 00783 A (CIBA GEIGY AG ;CAROZZI NADINE BARBARA (US); KOZIEL MICHAEL GENE (U) 11.Januar 1996 siehe Beispiele 5,7 ---</p>	8
A	<p>EP 0 657 538 A (ENEA ENTE NUOVE TEC) 14.Juni 1995 siehe das ganze Dokument ---</p>	16
-/--		

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 13, Dezember 1995, Seiten 522-527, XP002033963 MA, J.K.-C., ET AL.: "Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants" siehe das ganze Dokument ---	16
A	WO 91 06320 A (SCRIPPS CLINIC RES) 16.Mai 1991 siehe Seite 122 - Seite 123 ---	16
A	ACS SYMPOSIUM SERIES, Bd. 604, 13.März 1994, Seiten 56-69, XP000569928 MA J K -C: "ANTIBODY EXPRESSION IN PLANTS" siehe Seite 64 - Seite 67 ---	16
A	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 24, Nr. 1, 1.Januar 1994, Seiten 131-138, XP002003170 MA J K -C ET AL: "ASSEMBLY OF MONOCLONAL ANTIBODIES WITH IGG1 AND IGA HEAVY CHAIN DOMAINS IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS" siehe das ganze Dokument ---	16
A	SCIENCE, Bd. 268, XP002024034 HAQ, T.A., ET AL.: "Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants" siehe das ganze Dokument ---	1,16
P,A	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 30, 1996, Seiten 781-793, XP000677225 SCHOUTEN, A., ET AL.: "The c-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco" siehe das ganze Dokument -----	1-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/ 00285

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 16
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

SIEHE WEITERE ANGABEN

2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung: Obwohl der Anspruch 16 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers (Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird,) bezieht (Regel 39.1(iv) PCT), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/00285

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DD 263081 A		KEINE	
WO 9420628 A	15-09-94	AU 6355594 A	26-09-94
		CA 2158018 A	15-09-94
		EP 0687303 A	20-12-95
		JP 8507219 T	06-08-96
		PL 310524 A	27-12-95
		US 5633436 A	27-05-97
DE 3920034 A	31-05-90	KEINE	
WO 9600783 A	11-01-96	AU 2573595 A	25-01-96
		CA 2193859 A	11-01-96
EP 0657538 A	14-06-95	IT 1264083 B	10-09-96
WO 9106320 A	16-05-91	US 5202422 A	13-04-93
		AU 6753290 A	31-05-91
		CA 2071502 A	28-04-91
		EP 0497904 A	12-08-92
		JP 5504333 T	08-07-93
		US 5639947 A	17-06-97